

**MUTANT ATTENUE DE LISTERIA MONOCYTOGENES; SOUCHE RECOMBINANTE
DE LISTERIA MONOCYTOGENES, UTILISATION COMME VECTEURS
HETEROLOGUES D'ANTIGENES VACCINAL ET UTILISATION COMME VACCIN
OU COMPOSITION DIAGNOSTIQUE.**

Patent number: FR2686896

Publication date: 1993-08-06

Inventor: CHRISTINE KOCKS; GENEVIEVE MILON; PASCALE COSSART; PIERRE GOOSSENS

Applicant: PASTEUR INSTITUT (FR)

Classification:

- **International:** C12N1/20; C12N1/21; A61K39/02

- **European:** A61K39/02B; C07K14/195; C12N15/74

Application number: FR19920001128 19920131

Priority number(s): FR19920001128 19920131

Also published as:

 WO9315212 (A1)

Abstract of FR2686896

The invention discloses an attenuated mutant of *Listeria monocytogenes* incorporating in the act A gene or in its promotor a mutation capable of blocking or modifying the expression of the protein coded by the act A gene. This mutant can be used as a living vector for the expression of an heterologous ADN, particularly a gene coding for a viral, bacterial or parasitic protector antigen which is the target of T cells of subclass CD8. The recombinant mutant strains thus obtained may be used as a vaccine or diagnostic composition for checking the protection state of a host.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 686 896

(21) N° d'enregistrement national : 92 01128

(51) Int Cl⁵ : C 12 N 1/20, 1/21, A 61 K 39/02

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 31.01.92.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 06.08.93 Bulletin 93/31.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) : Cossart Pascale, Kocks Christine,
Goossens Pierre et Milon Geneviève.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix.

(54) Mutant atténué de *Listeria monocytogenes*; souche recombinante de *Listeria monocytogenes*, utilisation
comme vecteurs hétérologues d'antigènes vaccinal et utilisation comme vaccin ou composition diagnosti-
que.

(57) L'invention a pour objet un mutant atténué de *Listeria monocytogenes* comportant dans le gène act A ou dans le
promoteur de celui-ci un mutant apte à bloquer ou modifier l'expression de la protéine codée par le gène act A.

Ce mutant peut être utilisé en tant que vecteur vivant pour l'expression d'un ADN hétérologue, notamment d'un gène codant pour un antigène viral, bactérien ou parasitaire protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

Les souches mutantes recombinantes ainsi obtenus ont des applications en tant que vaccin ou composition de diagnostic pour le contrôle de l'état de protection d'un hôte.



La présente invention concerne une souche mutante atténuée de Listeria monocytogenes et ses applications immuno-thérapeutiques et diagnostiques, notamment pour la fabrication d'une souche recombinante 5 utilisable en tant que vaccin.

Listeria monocytogenes est un bacille aérobie facultatif, non sporulant, à gram-positif très répandu dans l'environnement et responsable de la listériose humaine et animale. La maladie se manifeste par des 10 infections opportunistes, soit par une méningite et/ou encéphalite, des septicémies ou par des avortements, avec un taux de mortalité élevé chez les nouveau-nés et les 15 adultes dont les mécanismes de défense sont affaiblis par la grossesse, une immunosuppression thérapeutiquement induite, une maladie sous-jacente ou la vieillesse. La listériose peut aussi atteindre des sujets apparemment sains.

Listeria monocytogenes est capable *in vivo* comme *in vitro* d'infecter une grande variété de types 20 cellulaires dont les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les entérocytes.

Après sa pénétration dans la cellule infectée, la bactérie lyse la membrane du phagosome grâce à une hémolysine qu'elle secrète. Au terme de cette étape, 25 la bactérie est dans le cytoplasme de la cellule hôte.

En outre, Listeria monocytogenes se caractérise par son aptitude à se propager dans les tissus par infection directe de cellule à cellule sans quitter le cytoplasme (Racz et al., 1970 (9)).

Peu de temps après son entrée dans la cellule hôte, la bactérie s'entoure d'actine filamenteuse (actine F) qui ultérieurement se réarrange en "comète" derrière la bactérie dans la direction opposée au mouve-

ment (Tilney et al., 1989, (1); Mounier et al., (1990) (13). L'actine polymérisée est constituée de microfilaments courts, orientés au hasard qui diffèrent des filaments d'actine longs habituellement observés dans les 5 cellules musculaires.

Les bactéries sont mobiles et laissent derrière elles des "comètes" d'actine F de plusieurs μm de longueur. Certaines sont incorporées dans des protubérances cytoplasmiques en forme de doigt, qui peuvent être 10 internalisés par les cellules voisines. Les deux membranes plasmiques entourant la bactérie sont alors lysées. Une fois dans le cytoplasme de la nouvelle cellule hôte, la bactérie peut se reproduire et commencer un nouveau cycle de dissémination.

15 Pendant ce processus de dissémination, les cellules de Listeria monocytogenes sont protégées du système immunitaire de l'hôte, et la dissémination de cellule à cellule représente par conséquent un facteur clé de virulence.

20 En isolant et analysant un mutant Tn 917-Lac inapte à se disséminer de cellule à cellule, les inventeurs on pu identifier une protéine de Listeria monocytogenes impliquée dans l'assemblage de l'actine induit par la bactérie.

25 Le gène codant pour cette protéine dénommée act A, fait partie d'un opéron (Mengaud et al., 1991 (b) (8)) dont la séquence nucléotidique complète a été récemment décrite (Vazquez-Boland et al., 1992 (12)).

30 La présente invention a ainsi pour objet une souche de listeria monocytogenes à virulence atténuée, caractérisée en ce qu'elle comporte, dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci, une mutation capable de bloquer ou de modifier sensiblement l'expression de la protéine codée par le gène act A.

35 La mutation peut être réalisée selon des

techniques connues, notamment par insertion dans le gène act A ou son promoteur, d'une séquence d'une ou plusieurs bases, de préférence un transposon stable, déletion d'une ou plusieurs bases, mutations telles que mutations par 5 mutagénèse dirigée, par exemple par PCR et notamment mutations faux-sens.

La mutation peut notamment être réalisée par insertion d'un transposon, tel que le transposon Tn917-lac, comme décrit dans Mengaud et al., 1991 (a) (7).

10 La mutation est effectuée de préférence dans le fragment d'ADN codant pour la séquence peptidique à motifs répétés comprise entre les aminoacides 235 à 315, 350 à 360, 367 à 385 et 389 à 393 de la séquence peptidique SEQ ID N° 1.

15 Un autre site de mutation avantageux, notamment d'insertion est situé en aval de l'adénosine en position 497 de la séquence nucléotidique du gène act A.

Cette position correspond à celle entre les aminoacides 61 et 62 de la séquence peptidique SEQ ID 20 N° 1.

Une souche particulièrement préférée selon la présente invention est la souche de la Listeria monocytogenes LUT 12 déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) le 30 janvier 1992 25 sous le numéro I-1167.

Les mutants selon l'invention sont aptes à conférer à des hôtes auxquels ils ont été administrés une protection contre une infection ultérieure par une souche pathogène de Listeria monocytogenes.

30 L'invention a donc également pour objet un vaccin humain ou vétérinaire comprenant en tant que composant actif une souche atténuée de Listeria monocytogenes, telle que définie précédemment.

35 Ce vaccin est apte à conférer une protection efficace à l'homme ou à l'animal notamment aux bovins et

ovins contre la listériose.

La réponse immunitaire générée par l'administration d'un mutant atténué tel que défini se traduit par la prolifération essentiellement de lymphocytes T de la 5 sous-classe CD8.

Les lymphocytes T de la sous-classe CD8 sont activés par des peptides liés à des antigènes de classe I du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) générés par la protéolyse de protéines synthétisées ou libérées 10 dans le cytoplasme de cellules présentant l'antigène.

Ainsi, les mutants atténués de Listeria monocytogenes selon l'invention, sont aptes à stimuler le système immunitaire par la voie qui utilise les molécules de classe I du CMH.

15 Il est par conséquent possible en transformant Listeria monocytogenes à l'aide d'un plasmide approprié d'introduire un gène hétérologue provenant de n'importe quel organisme et d'utiliser les souches recombinantes obtenues comme système d'expression d'ADN 20 hétérologue.

L'invention a ainsi également pour objet un mutant recombinant de Listeria monocytogenes caractérisé en ce qu'il comporte un ADN hétérologue soit inséré dans le génome d'un mutant atténué tel que défini précédem- 25 ment, soit porté par un plasmide se répliquant dans le mutant atténué.

l'ADN hétérologue consiste de préférence en un gène hétérologue codant pour un antigène protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

30 Cet antigène peut être d'origine bactérienne (par exemple de mycobactéries), parasitaire, (par exemple de Leishmania, Trypanosoma ou Toxoplasma) ou viral (virus de la grippe, virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) ou virus du Sida (VIH)).

35 Un mutant recombinant de Listeria monocytoge-

nes particulièrement intéressant comporte les gènes codant pour l'antigène gag et/ou l'antigène nef du VIH ou tout ou partie de l'enveloppe gp 120 du VIH 1 ou gp 140 du VIH 2 ou par un peptide tel que défini dans US-4 5 943 628.

La construction du mutant recombinant peut être réalisée par transformation d'un mutant atténué tel que défini ci-dessus, notamment du mutant LUT 12 à l'aide d'un plasmide approprié, et par exemple électroporation.

10 Avantageusement, le clonage de l'ADN hétérologue sera réalisé chez E. Coli et on utilisera un plasmide navette E. Coli - Listeria monocytogenes pour réaliser la transformation.

15 Comme plasmides, on peut citer pMKA (Sullivan et al., (14)) ou PHT 320 (Leredus et al., (15)).

Pour permettre l'expression du gène d'intérêt (gène hétérologue), il est avantageux d'insérer en amont du gène d'intérêt un promoteur fort de *Listeria*, tel que le promoteur *hly*.

20 Pour que le produit de traduction du gène d'intérêt puisse être sécrété, il est préférable de fusionner le gène d'intérêt au début de *hly* afin d'utiliser "la séquence signal" de la listériolysine O pour libérer la protéine d'intérêt codée par le gène hétérologue dans le cytoplasme d'une cellule d'hôte.

25 Les souches recombinantes de Listeria monocytogenes tels que définies ci-dessus conviennent de manière avantageuse pour la préparation d'un vaccin recombinant humain ou vétérinaire, contre une infection provoquée par un microorganisme produisant un antigène correspondant à la protéine codée par l'ADN hétérologue inséré dans le génome de Listeria monocytogenes recombinant.

30 35 Les vaccins selon l'invention peuvent être administrés par voie intra-veineuse, sous-cutannée,

intra-musculaire ou orale.

Une dose appropriée se situe entre 5.10^4 et 10^9 cellules/kg de poids.

5 Cette dose varie en fonction de la voie d'administration ainsi que de la sensibilité de l'hôte.

L'administration est de préférence répétée afin de conférer une protection efficace à l'hôte.

10 Les mutants recombinants de Listeria monocytogenes définis ci-dessus sont également appropriés à la préparation d'une composition de diagnostic destinée au contrôle de l'état de protection d'un hôte humain ou animal contre une infection provoquée par un microorganisme produisant un antigène correspondant à la protéine codée par l'ADN hétérologue inséré dans le génome de 15 Listeria monocytogenes recombinant ou exprimé dans cette souche lorsque porté par un plasmide.

20 Il suffira d'injecter localement la composition de diagnostic selon l'invention, par voie sous-cutanée par exemple, et d'observer après un certain temps de latence si une réaction inflammatoire a lieu ou non, à la manière du test à la tuberculine utilisé pour contrôler l'état de protection d'un hôte contre le bacille de la tuberculose.

25 On décrira ci-après l'obtention de la souche mutante LUT 12 de Listeria monocytogenes ainsi que ses propriétés en se référant à la fig. annexée représentant :

30 A : l'opéron lécithinase de Listeria monocytogenes (Vazquez.- Boland et al., 1992 (12) avec la position du transposon dans le mutant LUT 12 et la position des mutations par insertion de plasmides dans le mutant.

B : la séquence d'aminoacides de la protéine du gène act A.

Les traits noirs renforcés représentent des gènes dont les produits ont été caractérisés (mpl : metalloprotéase, Domann et al., 1991, (3) act A : (présente invention), plc B : lécithinase) ORFX, ORFY et 5 ORFZ sont des cadres de lecture ouverte.

P : indique le promoteur, les lignes en pointillées le produit de transcription et Ω un signal de terminaison de transcription potentiel.

10 La séquence signal potentielle et le segment transmembranaire sont soulignés. La région de motifs répétés est entourée. La flèche correspond à l'insertion de Tn 917-lac dans le gène actA du mutant LUT 12.

15 La numérotation débute à l'extrémité NH₂ de la protéine mature. Les résidus déterminés par microsé- quençage de la bande de 90 kDa sont imprimés en caractères gras et marqués par un astérisque.

I - Techniques générales de clonage et d'analyse d'ADN

20 Toutes les techniques de clonage et d'analyse ont été effectuées conformément aux protocoles standards (Sambrook et al. 1989 (10)) ou suivant les instructions du fabricant.

25 1'ADN chromosomique de Listeria monocytogenes a été préparé comme décrit par Mengaud et al., 1991 (b) (8). Les sondes pour Southern blot ont été préparées par PCR, purifiées à partir des gels d'agarose en utilisant le kit Geneclean (Bio 101, Inc, La Jolla, CA), et marquées en utilisant le système Multiprime d'Amersham.

30 Les hybridations selon Southern ont été réalisées à l'aide du système d'hybridation rapide (Amersham) sur des membranes de Nylon N (Amersham) dans un four pour hybridation Hybaid.

II - Isolement de la souche LUT 12 et détermination du point d'insertion du transposon

Une banque de mutants Tn 917-lac, produits à 5 partir de la souche de type sauvage L028 et du plasmide p TV32 portant le transposon Tn 917-Lac comme décrit par Mengaud et al., 1991 a (7), a été criblée sur des plaques de gélose au jaune d'oeuf préparée à partir de jaune d'oeuf frais dilué au 1:2 dans une solution de NaCl 150 mM, et d'addition de 12,5 ml de ce mélange à 250 ml de gélose additionnée d'une infusion de cerveau et de coeur (BHI) à 56°C. 10 15

Un mutant lécithinase-négatif ne produisant pas d'opacification du jaune d'oeuf même après une incubation prolongée et montrant un phénotype de type sauvage pour tous les autres caractères examinés a été appelée LUT 12.

A - Caractéristiques biologiques de ce mutant

20 Ce mutant avait à la fois une activité hémolytique et un taux de croissance in vitro identiques au type sauvage, mais se révélait de virulence très atténuée chez la souris.

TOXICITE

25 La DL₅₀ était plus élevée d'un facteur 4 log 10 que la DL₅₀ des bactéries du type sauvage (10^{8.55} bactéries au lieu de 10^{4.25}).

TESTS DE FORMATION DE PLAGES SUR CULTURES DE FIBROBLASTES

30 Des essais ont été effectués sur des fibroblastes 3T3 (ECA CC88031146). selon la technique décrite par Kuhn et al., 1990 (5), sauf que les infections étaient réalisées à des concentrations variées d'inoculum : 1 à 25 µl de sous-cultures bactériennes de 2 heures 35 (A_{600nm} de 0,45) soit non diluées soit diluées au 1/10.

Cet essai révèle l'aptitude de Listeria monocytogenes à se multiplier de manière intracellulaire et à se disséminer sur des couches simples de fibroblastes revêtues d'une couche de gélose contenant de la gentamicine à une concentration létale pour les bactéries extracellulaires mais non pour les bactéries intracellulaires. Après plusieurs jours, des zones de cellules mortes détruites par l'infection bactérienne sont visibles à l'oeil nu sous forme de "plages".

Les bactéries LUT 12 mutantes étaient inaptes à former des plages sur des couches simples de fibroblastes 3T3.

ESSAI DE DISSEMINATION SUR DES MACROPHAGES DE MOELLE OSSEUSE

Une observation au microscope optique de la dissémination de Listeria monocytogenes sur des couches simples de macrophages primaires de moelle osseuse a en outre été réalisée comme suit.

Des suspensions contenant des macrophages ont été préparées à partir de moelle osseuse d'une souris femelle C57BL/6 âgée de 7 semaines, et cultivées dans un milieu RPMI contenant 10% de sérum foetal de veau en présence de surnageant L. 4.10^5 macrophages dérivés de moelle osseuse obtenus au jour 6 ont été ensemencés dans les lamelles en verre rondes (diamètre 12 mm) la veille de l'utilisation. Les macrophages ont été infectés avec une MI (multiplicite d'infection) de 0,04 (une bactérie pour 25 macrophages, résultant en à peu près 1% de cellules infectées), de manière à pouvoir observer des points individuels d'infection, générés par la progéniture d'une seule bactérie. L'infection a été réalisée comme décrit pour un macrophage J774.

Après 30 minutes et après 8 heures, ces monocouches cellulaires ont été fixées et colorées avec une solution de Giemsa.

Après 8 heures, la progéniture des bactéries de type sauvage s'était disséminée à de nombreuses cellules hôtes nouvelles, et des bactéries portant des protubérances à leur extrémité pouvaient être observées.

5 Au contraire, la progéniture du mutant LUT 12 est restée enfermée à l'intérieur d'une seule cellule infectée. Les bactéries mutantes ont, soit formé des microcolonies ou étaient disséminées dans le cytoplasme des cellules hôtes, mais aucune protubérance contenant des bactéries

10 ne pouvaient être détectés.

Ce résultat indique que la bactérie mutante se multiplie à l'intérieur des cellules infectées, mais est incapable d'infecter des cellules adjacentes par dissémination de cellule à cellule.

15 TEST DE CROISSANCE SUR DES MACROPHAGES J774
Un essai démontrant que la bactérie mutante LUT 12 était apte à se multiplier de manière intracellulaire a été réalisé au moyen d'un test de croissance sur des macrophages J774.

20 Cet essai a été réalisé sur des couches simples de J774 dans des flacons de culture de tissus en matière plastique de 25 cm³. Les cellules étaient infectées avec une MI de 10 bactéries par cellule. Le nombre de bactéries intracellulaires était calculé après 2, 6 et 10 heures de croissance sur un milieu contenant de la gentamycine (5 µg/ml) par lyse des mono-couches cellulaires, lavage avec de l'eau distillée froide et étalement de dilutions appropriées sur des plaques contenant un milieu BHI.

25

30 Après une durée de 10 heures, les courbes de croissance des bactéries de type sauvage et LUT 12 étaient identiques.

OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Le comportement intracellulaire du mutant LUT 12 a été observé au microscope électronique. Des macro-

phages J774 étaient infectés avec des bactéries de type sauvage ou la souche mutante pendant 30 minutes, suivie par une incubation de 60 à 210 minutes dans un milieu contenant la gentamycine. Pour le mutant et le type 5 sauvage, on pouvait observer des bactéries libres dans le cytoplasme à 1 h 1/2 d'infection. A ce moment, le type sauvage et le mutant étaient entourés par une couche mince de matériel granulaire crêpé, mais seul le type sauvage comportait du matériel filamentaire assemblé à 10 sa surface, constitué de filaments d'actine. A 4 h après l'infection, les bactéries de type sauvage étaient entourées par d'épaisses couches de filaments d'actine F. Au contraire, les bactéries mutantes LUT 12 étaient presque nues. Même le revêtement fin crêpé observé au 15 moment précoce de l'infection avait disparu.

Pour visualiser l'association d'actine F bactérienne de manière spécifique, les auteurs ont réalisé des colorations en double fluorescence à l'aide de FITC-phalloïdine, une toxine fongique se liant à 20 l'actine F, et avec un sérum anti-L.monocytogenes, suivi par un second anti-corps couplé à la rhodamine, pour détecter les bactéries. Les macrophages J774 étaient infectés depuis 4h avec les bactéries de type sauvage ou mutant. Tandis que les bactéries de type sauvage se 25 coloraient positivement avec la FITC-phalloïdine, les bactéries mutantes LUT 12, bien que détectables avec le sérum anti-L.monocytogenes restaient invisibles avec la coloration de l'actine.

Ces résultats démontrent que les bactéries 30 LUT 12 s'échappent des phagosomes aussi efficacement que les bactéries de type sauvage et se multiplient dans le cytoplasme. Cependant, les bactéries mutantes ne sont jamais associées avec de l'actine F, sont incapables de se déplacer à l'intérieur de la cellule, et ne peuvent 35 infecter des cellules voisines par dissémination directe.

Ces observations suggèrent que le mutant LUT 12 est déficient en un composant nécessaire pour le procédé de formation de filaments d'actine induit par Listeria monocytogenes.

5 **B - DETERMINATION DU POINT D'INSERTION DU TRANSPOSON**

Ce mutant a été analysé par Southern blot pour déterminer le nombre de transposons insérés dans son chromosome.

10 L'ADN chromosmique a été digéré par Bam HI, Eco RO, Hind III, Kpn I et Pst I.

15 On a utilisé deux sondes différentes correspondant à Tn 917-lac (Shaw et Clewell, 1985 (11)): une sonde recouvrant 515 paires de bases du gène de résistance à l'érythromycine, obtenue par PCR avec les oligonucléotides 5'-TTG GAA CAG GTA AAG GGC ATT TAA-3' (position 821 à 844) et 5'-AGT AAA CAG TTG ACG ATA TTC TCG-3' (position 1313 à 1336), et une sonde recouvrant le fragment interne Hind III du transposon obtenue par PCR avec les oligonucléotides 5'-ACA ATT AAT GTC TCC CAT ATT-3' (position 3082 à 3102) et 5'(ACT GAT AAT TAA CCA AAA CAG-3' (position 4295-4315).

20 La jonction transposon-chromosome a été clonée à partir d'une banque d'ADN chromosomique obtenue par restriction avec Eco RI/Kpn I dans pUC 18. Un clone comportant un segment d'insertion, correspondant à la jonction chromosome-transposon a été isolé et séquencé directement à partir du plasmide par utilisation d'un oligonucléotide s'hybridant avec l'extrémité droite du transposon (5'-CTA AAC ACT TAA GAG AAT TG-3', position 5244 à 5263).

25 Le transposon était inséré après l'adénine 497 dans la séquence nucléotidique du fragment Hind III - Eco RI du gène act A de l'opéron identifié par Mengaud et al., 1991 (b) (8), dont la séquence nucléotidique a 30 été décrite par Vazquez-Boland et al., 1992 (12).

Le point d'insertion du transposon Tn 917-lac est représenté sur le schéma de la fig. (A).

Le phénotype lecithinase-négatif du mutant LUT 12 est vraisemblablement dû à un effet polaire de la 5 mutation par insertion dans act A, dans la mesure où le 3ème gène de l'opéron plcB code pour la lécithinase.

Des études complémentaires ont été réalisées qui ont démontré que la perte de l'activité de polymérisation de l'actine était bien due à une perte d'expression 10 du gène Act A.

Des mutants ont été réalisés par recombinaison homologue entre le chromosome de Listeria monocytogenes et des fragments correspondant à des parties du gène plcB et des cadres de lecture ouverte ORFX/Y et ORFZ 15 (fig. (A)) situés en aval du gène act A par insertion de plasmides en divers sites.

Des études d'immunofluorescence par utilisation de FITC-phalloïdine et marquage à la rhodamine de bactéries dans des macrophages J 774 infectés ont montré 20 que les mutants plcB, ORFX/Y et ORFZ étaient associés à des filaments d'actine F tout comme les bactéries de type sauvage. Ces études ont été complétées par des études de microscopie électronique qui ont montré que ces mutants étaient aptes à stimuler l'assemblage de l'actine de la 25 même manière que le type sauvage.

Ces analyses montrent par conséquent que des mutations en aval de act A n'affectent pas l'assemblage de l'actine A et suggèrent que l'incapacité du mutant LUT 12 à polymériser l'actine cellulaire est due à l'absence 30 d'expression du gène act A.

Une transformation du mutant LUT 12 réalisée avec act A montre par ailleurs que le phénotype de type sauvage est restauré, ce qui exclut la possibilité d'une mutation spontanée en un autre site du chromosome.

35 Ces résultats démontrent ainsi que le produit

du gène act A est nécessaire pour l'assemblage de l'actine de Listeria monocytogenes et par conséquent pour son pouvoir pathogène.

Le produit du gène act A a été déterminé
5 comme décrit ci-après :

III - Analyse du produit du gène act A

La séquence nucléotidique du gène act A
10 laisse supposer que celui-ci code pour une protéine de 639 aminoacides avec une séquence signal et une région transmembranaire (Vazquez Boland et al., 1992 12()).

Des études complémentaires ont été réalisées
15 d'une part par analyse comparée des protéines de surface de Listeria monocytogenes de type sauvage et de la souche LUT 12.

Les isolats bactériens ont été cultivés dans
200 ml de bouillon d'infusion cerveau-coeur (BHI, Laboratoires DIFCO, Detroit, Michigan) additionné
20 d'érythromycine à 5 µg/ml pour LUT 12, sous agitation à 160 tpm sur un agitateur Gyrotory G10 (New Brunswick Scientific) à 37° C pendant 18 h.

Les bactéries ont été récoltées par centrifugation (5000 g pendant 20 minutes) et lavées à trois
25 reprises dans une solution saline de tampon phosphate (PBS).

Le culot obtenu a été remis en suspension dans 4 ml de PBS et du SDS a été ajouté à une concentration finale de 1 %. A cette concentration de SDS, les
30 cellules de L. monocytogenes ne se lysent pas. L'absence de lyse bactérienne a été vérifiée au microscope. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante, les bactéries ont été centrifugées (50.000 g pendant 10 minutes) et le surnageant concentré par ultrafiltration
35 sur des microconcentrateurs (Centricom 30, Amicon) et

conservé à -20° C.

La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la méthode à l'acide bicinchoninique (Pierce). La concentration en protéines a été ajustée à 5 300 µg/ml pour l'électrophorèse. 10 µl d'extrait ont été mélangés avec 10 µl de tampon (SDS à 2 %, glycérol à 10 %, mercaptoéthanol à 5 %, bleu de bromophénol à 0,002 % et Tris HCl 0,02 M), bouillis pendant 3 minutes à 100° C. L'électrophorèse a été effectuée à 60 mA pendant 120 10 minutes à travers des gels discontinus de polyacrylamide (Laemmli, 1970 (6)). les bandes ont été visualisées par coloration à l'argent (Heukeshoven et Dernick, 1985 (4)).

Pour le marquage de la surface cellulaire, on a centrifugé 400 ml d'une culture de 18 heures de L. 15 monocytogenes; les bactéries ont été lavées à 3 reprises avec PBS à pH 7,4 et remises en suspension dans 8 ml de PBS PH 8,0 à 4° C.

Les bactéries ont ensuite été traitées avec 20 de la sulfosuccinimido biotine (sulfo-NHS-biotine; Pierce) à une concentration finale de 0,5 mg/ml pendant 2 minutes sous agitation modérée.

Les cellules ont été lavées à trois reprises avec PBS à pH 7,4 et extraites par extraction au SDS.

Les extraits correspondant à 7 µg de protéines 25 par couloir ont été déposés sur des gels SDS et transférés comme décrit par De Rycke et al., 1989 (2) sur nitrocellulose (BA 85, Schleicher et Schüll. Les filtres de nitrocellulose ont été saturés pendant une nuit dans PBS à 0,5 % de gélatine et incubés pendant 1,5 heure avec 30 de la streptavidine conjuguée à de la peroxydase (Jackson) dans du PBS contenant 0,5 % de gélatine et 0,1 M de Tween 20. Après différents lavages dans le même tampon, les bandes réactives ont été révélées avec 0,5 mg/ml de 4-chloro-1-naphtol (Biorad) et 0,03 % v/v d'H₂O₂ dans 35 l'eau.

Les analyses des gels d'électrophorèse montrent un bande de 90 kDa pour le type sauvage qui est absente chez la souche LUT 12. Cette bande est également retrouvée chez les mutants plcB et les mutants LUT 12 transformés par act A mentionnés ci-dessus.

Les analyses de marquage de surface par la sulfosuccinimido-biotine montrent de façon directe une protéine biotinylée de 90 kA chez les bactéries du type sauvage qui est absente chez la souche mutante LUT 12.

10 Pour identifier sans ambiguïté la protéine 90 kDa, la bande de 90 kDa a été isolée et la séquence des 6 aminoacides de l'extrémité NH₂ a été déterminée et comparée avec la séquence d'aminoacides déduite de la séquence nucléotidique du gène lac A.

15 Les extraits sur SDS correspondant à 100 µg de protéines par couloir ont été mis à bouillir dans un tampon d'échantillonage SDS contenant 7 % (p/v) d'urée avant de réaliser une électrophorèse sur des gels au SDS à 7,5 %.

20 Les protéines séparées ont été transférées sur une membrane Problott (Applied Biosystems) dans du Tris 50 mM - borate 50 mM pendant 17 heures à 4 à 5 volts/cm. Les protéines ont été colorées pendant 5 secondes à l'aide de noir amido à 0,1 % dans une solution d'acide acétique à 1 % et de méthanol à 40 %, et rincées soigneusement à l'eau. Une bande de 90 kDa a été découpée dans plusieurs couloirs. Les protéines de la membrane ont été séquencées par dégradation selon Edman dans un séquenceur 740 A d'Applied Biosystems, avec, en ligne un analyseur HPLC PTH 120 A programmé par le fabricant pour la membrane Problott. Les séquences d'aminoacides ont été analysées sur un ordinateur Data General MV 10000 à l'Unité d'Informatique Scientifique de l'Institut Pasteur.

35 La séquence Ala-Thr-Asp-Sec-Glu-Asp de la

protéine isolée correspond exactement aux amino-acides du site de clivage de la séquence signal de prédicta d'après la séquence peptidique-prédicta à partir du gène act A (fig. B).

5 Par conséquent, le produit mature du gène act A est une protéine de 610 aminoacides avec un poids moléculaire calculé de 67 kDa. Elle a un poids moléculaire apparent de 90 kDa et est exprimée à la surface de la bactéries.

10 Cette protéine est nécessaire à l'assemblage de l'actine F et son absence conduit à une atténuation très importante de la virulence de Listeria monocytogenes. Par conséquent, toute mutation affectant le gène act A ou son promoteur et modifiant sensiblement ou empêchant 15 l'expression de son produit permettra l'obtention d'une souche atténuée non pathogène conformément à l'invention.

On rapportera ci-après les résultats obtenus *in vivo* avec la souche LUT 12 sur la protection de souris contre une infection par Listeria monocytogenes.

20 **IV - Effets *in vivo* de la souche LUT 12 sur la souris**
 Le comportement de LUT 12 a été étudié après injection intraveineuse dans la rate et le foie de souris, qui sont les principaux organes cibles où L. monocytogenes de type sauvage expriment leur pathogénicité. Les essais cliniques utilisées étaient les suivants : les foies et rates des souris infectées étaient récoltés à différents moments après l'infection et homogénéisées disséqués pour permettre la libération de bactéries, et les bactéries vivantes étaient comptées *in vitro*. On a ainsi établi que dans la rate, le nombre de LUT 12 croissait pendant les 24 premières heures et décroissait régulièrement jusqu'au jour 5.

Dans le foie, leur nombre restait constant

jusqu'au jour 4, période où l'élimination des bactéries était hautement efficace (plus de 3 log 10 bactéries sont détruites entre le jour 4 et le jour 5).

5 Des essais supplémentaires ont en outre montré que des souris préablement infectées par LUT 12 étaient résistantes à une ré-infection par le type sauvage L028 de L. monocytogenes.

10 D'autre part, des essais ont été réalisés pour déterminer si des rates récoltées de souris infectées par LUT 12 contenaient des lymphocytes T aptes à conférer une protection à des receveurs syngéniques naïfs contre le type sauvage virulent de L. monocytogenes. La protection conférée a été déterminée par comptage des L. monocytogenes vivantes, à la fois dans les foies et les 15 rates des souris receveuses 48 heures après l'infection. Lorsqu'elles étaient récoltées au jour 7 après l'infection par la souche mutante LUT 12, les rates contenaient des cellules aptes à protéger les receveurs d'un inoculum infectieux du type sauvage de L. monocytogenes.

20 Les cellules conférant une protection se sont révélées être des lymphocytes T appartenant à la sous-classe CD8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

5 1. Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M. and Sansonetti, P. J. (1990). Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 59, 1048-1058.

10 2. De Rycke, J., Phan-Thanh, L. and Bernard, S. (1989). Immunochemical identification and biological characterization of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 983-988.

15 3. Domann, E., Leimeister-Wächter, M. Goebel, W. and Chakraborty, T. (1991). Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* 59, 65-72.

20 4. Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.

25 5. Kuhn, M., Prévost, M.-C., Mounier, J. and Sansonetti, P.J. (1990). A nonvirulent mutant of *Listeria monocytogenes* does not move intracellularly but still induces polymerisation of actin. *Infect. immun.* 58, 3477-3486.

30 6. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

7. Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.-A., Milon, G. and Cossart, P. (1991a). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene which is autoregulated. *Mol. Microbiol.* 5, 2273-5 2283.

8. Mengaud, J., Geoffroy, C. and Cossart, P. (1991b). Identification of a novel operon involved in virulence of *Listeria monocytogenes*; its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* 59, 1043-1049. 10

9. Racz, P., Tenner, K. and Szivessy, K. (1970). Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa. I. Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelial cells. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 17, 221-236. 15

10. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). 20 Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).

11. Shaw, J.H. and Clewell, D.B. (1985). Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin- B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J. Bact.* 164, 782-796. 25

12. Vazquez-Boland, J.-A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud J., and Cossart, P. (). 30 Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.*, Jan. 1992, p. 219-230.

13. Tilney, L.G. Connelly, P.S. and Portnoy, D. A. 35 (1990). Actin filament nucleation by the bacterial

pathogen, *Listeria monocytogenes*, *J. Cell. Biol.* 111,
2979-2988.

14. ullivan et al., *Gene*, 1984, 29, p. 21-26.

5

15. Leredus et al., *Gene*, 1991, 108, p. 115-129.

LISTE DES SEQUENCES

I - INFORMATION GENERALE

5

(1) DEMANDEUR : INSTITUT PASTEUR

(2) TITRE DE L'INVENTION :

10

Mutant atténué de Listeria monocytogenes,
souche recombinante de Listeria monocytogenes,
utilisation comme vecteurs hétérologues d'anti-
gène vaccinal et utilisation comme vaccin ou
composition diagnostique.

(3) NOMBRE DE SEQUENCES : 1

15

II - INFORMATION POUR SEQ ID N° 1

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : protéine

LONGUEUR : 610 aminoacides

TYPE DE MOLECULE : protéine de surface

20

ORIGINE

ORGANISME : Listeria monocytogenes

LIGNEE CELLULAIRE : LO 28

CARACTERISTIQUE

NOM DE LA PROTEINE : produit du gène Act A

25

III - DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

-29 MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFA

30

1 ATDSEDSLNTDEWEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIKE
46 LEKSNKVRNTNKAIDLAMLKEAKGPNINNNNSEQTNAAINEE
91 ASGADRPAIQVERRHPGLPSDAAEIKRKRKAIASSDSELESLYT
136 PDKPTKVNNKKVAKESVADASESDLDSSMQSADESSPQPLKANQQ
181 PFFFVKFKIKDAGKWRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLIDQLLT
226 KKSEEVNAS
235 DFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFnAPATSEPSSF
270 EFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFnAPATSEPSSF
305 EFPPPPTEDELEIETIRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNF
350 DFPPPIPTEEEELNGGGR
367 PTSEEFSSSLNSG
379 DF TDDENSET
389 TEEEIDRLADLDRGRTGKHSRNRAGFLPINPFASSPVPSL
428 SPKVSKISAPALISDITKKTPFKNPSPQLNVFNKTTKTVTKP
473 TPVKTAPKLAELPATKPQETVLRNKPTEKQAEVNQKQINMPS
518 LPVIQKEATESDKEEMKPQTEKVMVEESESANNANGKNRSAIGIEE
563 GKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVFSI.GAFIKLJOL
607 RKNN

35

SYMBOLES DES ACIDES AMINES

	A	Ala	alanine
5	C	Cys	cystéine
	D	Asp	acide aspartique
	E	Glu	acide glutamique
	F	Phe	phénylalanine
	G	Gly	glycine
10	H	His	histidine
	I	Ile	isoleucine
	K	Lys	lysine
	L	Leu	leucine
	M	Met	méthionine
15	N	Asn	asparagine
	P	Pro	proline
	Q	Gln	glutamine
	R	Arg	arginine
	S	Ser	sérine
20	T	Thr	thréonine
	V	Val	valine
	W	Trp	tryptophane
	Y	Tyr	tyrosine

REVENDICATIONS

1. Mutant atténué de Listeria monocytogenes comportant, dans le gène act A ou dans le promoteur de celui-ci, une mutation apte à bloquer ou modifier 5 sensiblement l'expression de la protéine codée par le gène act A.
2. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mutation consiste en une insertion, une déletion ou une 10 mutation par mutagénèse dirigée.
3. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la mutation consiste en l'insertion d'un transposon stable.
- 15 4. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 3, caractérisé en ce que le transposon stable est le transposon Tn917-lac.
- 20 5. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mutation est effectuée dans le fragment d'ADN codant pour la séquence peptidique à motifs répétés, comprise entre les aminoacides 235 à 315, 350 à 360, 367 à 385 et 389 à 393 de la séquence SEQ ID n°1.
- 25 6. Mutant atténué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la mutation consiste en une insertion entre les aminoacides 61 et 62 de la séquence peptidique SEQ ID n° 1.
- 30 7. Mutant atténué de Listeria monocytogenes selon la revendication 6, dénommé LUT 12, déposé à la CNCM le 30 janvier 1992 sous le n° I-1167.
- 35 8. Vaccin humain ou vétérinaire, caractérisé en ce qu'il comprend en tant que composant actif une souche mutante atténuée de Listeria monocytogenes selon l'une des revendications précédentes.

9. Souche recombinante de Listeria monocytogenes, caractérisée en ce qu'elle comporte un ADN hétérologue, soit inséré dans le génome d'un mutant atténué selon l'une des revendications précédentes, soit porté par un plasmide qui se réplique dans le mutant atténué.

10 10. Souche recombinante selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'ADN hétérologue consiste en un gène hétérologue codant pour un antigène protecteur cible de lymphocytes T de la sous-classe CD8.

11. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène bactérien, notamment de mycobactéries.

12. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène parasitaire, notamment de Leishmania, de Tripanosoma ou de Toxoplasma.

13. Souche recombinante selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène viral, notamment du VIH, du virus de la chorioméningite lymphocytaire ou du virus de la grippe.

14. Souche recombinante selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'antigène est l'antigène gag et/ou l'antigène nef du VIH et/ou tout ou partie de l'enveloppe gp 120 du VIH1 ou gp 140 du VIH2.

15. Souche recombinante l'une des revendications 9 à 14, caractérisée en ce qu'elle comporte un promoteur de Listeria en amont de l'ADN hétérologue.

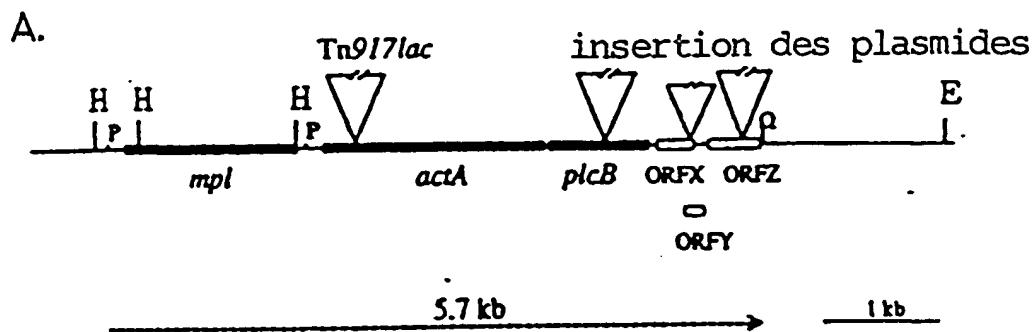
16. Souche recombinante selon la revendication 15, caractérisée en ce que le promoteur est le promoteur hly.

17. Souche recombinante selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'ADN hétérologue est fusionné avec le début du gène hly, de manière à utiliser la séquence signal de la listeriolysine O pour secréter le produit de l'ADN hétérologue dans le cytoplasme de la

cellule hôte.

18. Vaccin humain ou vétérinaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend en tant que composant actif une souche recombinante selon l'une des revendications 9 à 17.

19. Composition de diagnostic comprenant une souche recombinante de Listeria monocytogenes selon l'une des revendications 10 à 17, pour le contrôle de l'état de protection d'un hôte humain ou animal contre une infection provoquée par un microorganisme comprenant un antigène sensiblement identique à celui codé par le gène hétérologue inséré dans la souche mutante recombinante ou porté par un plasmide se répliquant dans la souche mutante recombinante.



B.

-29 MGLNREMRAVVETANCITINPDLIFA

1 * * * * * ATDSEDSSLNTDEWEEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIKE
 46 LEKSNKVRNTNKAIDLIAMLKEKAEGPNINNNNSEQTENAAINEE
 91 ASGADRPAIQVERRHGPGLPSDSAEEIKRRKAIASSDSELESLY
 136 PDKPTKVNKKKVAKESVADASESDLSSMQSADESSPQP LKANQQ
 181 PFFPKVFKKIKDAGKWRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLIDQLLTK
 226 KKSEEVNAS
 235 DFPPTDEELRLALPETPMLLGFnPATSEPSSF
 270 EFPPPTDEELRLALPETPMLLGFnPATSEPSSF
 305 EFPPPTDEDELEIIRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNFS
 350 DFPIPIPTEEELNGRGGR
 367 PTSEEFSSLNSG
 379 DF TDDENSET
 389 TEEEIDRLADLRDRGTGKHSRNAGFLPLNPFASSPVPSL
 428 SPKVSKISAPALISDITKKTPFKNPSQPLNVEFKTTTKTVTKP
 473 TPVKTAPKLAELPATKPQETVIRENKTPIEKQAETNKQSINMPS
 518 LPVIQKEATESDKEEMKPQTEEKVEESESANANGKNRSAGIEE
 563 GKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTLILAMLAIGVESLGAFIKLIOL
 607 RKNN

FIG. 1

**INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national
FR 9201128
FA 466860
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 58, no. 11, Novembre 1990, WASHINGTON US pages 3770 - 3778 A. N. SUN ET AL 'Isolation of listeria monocytogenes Small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread' * le document en entier plus particulièrement page 3775 colonne de gauche *</p> <p>---</p>	1-4
D,A	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 60, no. 1, Janvier 1992, WASHINGTON US pages 219 - 230 JOSE-ANTONIO VAZQUEZ-BOLAND ET AL 'Nucleotide sequence of the lecithinase operon of Listeria monocytogenes and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread' * page 226, colonne de droite * * page 228, colonne de droite * * abrégé *</p> <p>---</p>	1-4
D,A	<p>INFECTION AND IMMUNITY. vol. 58, no. 11, Novembre 1990, WASHINGTON US pages 3477 - 3486 M. KUHN ET AL 'A non-virulent mutant of Listeria monocytogenes does not move intracellularly but still induces polymerization of actin' * le document en entier *</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)
		A61K

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

T : théorie ou principe à la base de l'invention

- X : particulièrement pertinent à lui seul
- Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
- A : pertinente à l'encontre d'au moins une revendication ou avenir-plan technologique général
- O : divulgation non écrite
- P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure
à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date

de dépôt ou qu'à une date
D : cité dans la demande

D : être dans la famille
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9201128
FA 466860
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	<p>CELL. vol. 68, 7 Février 1992, CAMBRIDGE, MA US pages 521 - 531 C. KOCKS ET AL 'L. monocytogenes-induced Actin assembly requires the ActA gene product , a surface protein' * le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-19
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)		
1		
	<p>Date d'achèvement de la recherche 15 OCTOBRE 1992</p>	Examinateur LE CORNEC N.D.R.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.